

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :

G01N 27/12, 33/543

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/34140

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

18. September 1997 (18.09.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00494

(22) Internationales Anmeldedatum: 12. März 1997 (12.03.97)

(30) Prioritätsdaten:

196 10 115.8

14. März 1996 (14.03.96)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUNHOFER GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HINTSCHE, Rainer [DE/DE]; Schwedter Strasse 14, D-10119 Berlin (DE).  
PAESCHKE, Manfred [DE/DE]; An der Wildbahn 59, D-16352 Basdorf (DE).

(74) Anwalt: OLGEMÖLLER, Luitgard; Leonhard Olgemöller Fricke, Josephspitalstrasse 7, D-80331 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

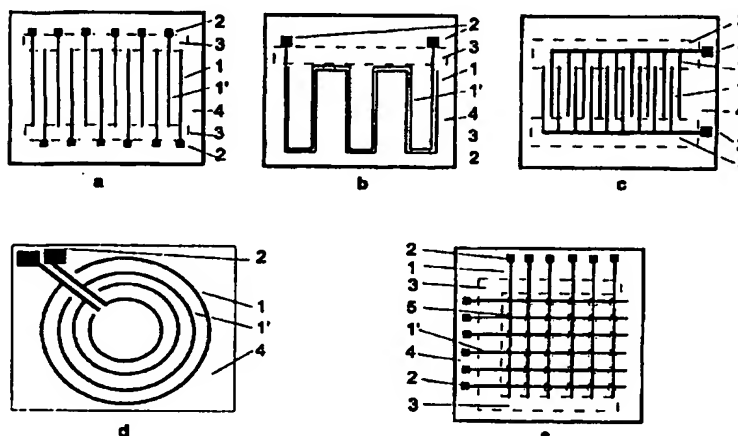
Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: DETECTION OF MOLECULES AND MOLECULE COMPLEXES

(54) Bezeichnung: DETEKTION VON MOLEKÜLEN UND MOLEKÜLKOMPLEXEN



(57) Abstract

The invention concerns a process for detecting molecules or molecule complexes. A measurement probe is brought into contact with an ultra-microelectrode arrangement comprising at least two electrode structures configured in such a way that the distances between the different structures lie in the ultra-micro range; an alternating electrical field is created by application of an electrical potential; and the current or potential fluctuations caused by species present or created in the measurement probe are measured.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Detektieren von Molekülen oder Molekülkomplexen, wobei eine Meßprobe mit einer Ultra-Mikroelektrodenanordnung (1, 1', 2, 3, 4, 5) in Kontakt gebracht wird, welche mindestens zwei Elektrodenstrukturen (1, 1') aufweist, die derartig zueinander angeordnet sind, daß die Abstände zwischen den verschiedenen Strukturen im Ultra-Mikrobereich liegen, durch Anlegen eines elektrischen Potentials ein elektrisches Wechselfeld erzeugt wird und die Strom- oder Potentialveränderungen gemessen werden, die durch in der Meßprobe vorhandene oder entstehende Spezies verursacht werden.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LX	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

## Detektion von Molekülen und Molekülkomplexen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Detektieren von molekularen Spezies sowie einen elektrischen Sensor hierfür.  
5 Solche elektrischen Sensoren, auch Ultra-Mikroelektrodenarrays genannt, sind für die chemische Analytik und Prozeßkontrolle auf verschiedenen Gebieten wie Gesundheitswesen, Biotechnologie, Umweltschutz und chemischer Industrie einsetzbar. Sie stellen ein vergleichsweise einfaches Meßsystem dar, das die Bindung  
10 oder Anlagerung von Molekülen im elektrodennahen Raum meßbar erfaßt.

Bisher bekannt sind optische Sensoren, die unter anderem nach dem Prinzip der **Evanescent-Wave** [vgl. Feldman, et al., Biosens. & Bioelectron., 10 (1995) 423] oder der **Lichtreflexion** [vgl. Domenici et al., Biosens. & Bioelectron., 10 (1995) 371 oder Brecht, Gauglitz, Biosens. & Bioelectron., 10 (1995), 923] oder der **Surface Plasmon Resonanz** [vgl. Häuseling et al., Langmuir, 7 (1991) 1837 oder U.Jönsson et al., BioTechniques 11 (1991), 620]  
20 Bindungseffekte oder die Anlagerung von Molekülen in dünnen Schichten nachzuweisen gestatten.

Für die direkte elektrische Auslesung solcher Bindungsereignisse wurden bereits ein potentiometrisches Meßverfahren [vgl. Bergfeld, Biosens. & Bioelectron., 6 (1991), 55], ein kapazitives Meßverfahren [vgl. Swietlow, Electroanalysis, 4 (1992), 921] und ein impedimetrisches Meßverfahren [vgl. Knichel et al. Sens.&Act. B 28, (1995), 85] beschrieben. Auch Elektrodenanordnungen nach dem EIS-Prinzip (EIS: Elektrolyt-  
30 Insulator-Semiconductor) wurden vorgeschlagen [vgl. Schyberg et al. Sens.&Act. B 26-27 (1995) 457 oder Souteyrand et al. Sens.&Act. B 20, (1994) 63], wobei der Isolator als Kopplungs- und Übertragungselement wirkt.

35 Bei diesen elektrochemischen Meßanordnungen dienen räumlich weit voneinander entfernte Elektroden zur Erfassung von Molekülen in der elektrodennahen dünnen Grenzschicht, die aber durch eine vergleichsweise große Menge an Elektrolyten und anderen

Substanzen zwischen den Elektroden in vielfacher Weise negativ beeinflusst werden.

Es wurden auch Anwendungen bekannt, bei denen dünne  
5 Molekülschichten als Gate zwischen Drain und Source von Transistoren abgeschieden wurden und Informationen über die organische Schicht liefern [vgl. Kruse et al. Sens.&Act. B 6 (1992), 101 oder Uhe et al. Electroanalysis, 6(7) (1994), 543].

10 Allen diesen beschriebenen elektrischen Verfahren mit Elektroden ist gemeinsam, daß sie keine Anordnungen aufweisen, die molekularen Dimensionen nahekomen; in allen diesen Anwendungen sind die sensortypischen Abmessungen, z.B. zwischen Meß-, Referenz- und Arbeitselektroden, um Größenordnungen von den  
15 molekularen Dimensionen entfernt.

Der Erfindung liegt **die Aufgabe zugrunde**, ein Verfahren mit Hilfe eines elektrischen Sensors vorzuschlagen, das die Detektion von Molekülen und Molekülkomplexen mit höherer  
20 Nachweisempfindlichkeit bei vergleichsweise geringerem Systemaufwand ermöglicht.

Die erfindungsgemäße Lösung dieser Aufgabe ist in Anspruch 1 umschrieben. Die weiteren Ansprüche zeigen bevorzugte  
25 Ausgestaltungen auf.

Erfindungsgemäß wird das Verfahren zur Detektion von Molekülen und Molekülkomplexen mit einer Anordnung durchgeführt, die Ultramikroelektrodenarrays aufweist, deren Elektrodenstrukturen  
30 so eng beieinander angeordnet werden, daß sie der Größe großer Molekülkomplexe, z. B. von Immunoproteinen oder DNS-Molekülen, nahekomen. Benutzt wird insbesondere der Effekt, daß sich zwischen nahe benachbarten Elektroden elektrische Wechselfelder erzeugen lassen und der resultierende Strom hauptsächlich von  
35 den detektierten Molekülen und Molekülkomplexen im elektrodennahen Raum beeinflusst wird. Die Form und Feinstruktur der Elektroden ist dabei relativ frei wählbar, während die minimale Entfernung der Elektroden selbst typischerweise 3 µm,

bevorzugt 1  $\mu\text{m}$  unterschreiten sollte.

Die Beeinflussung kann durch Diffusion, durch Anlagerung oder Bindung der zu messenden Spezies erfolgen. Durch diese Art der Felderzeugung und Messung mit Hilfe insbesondere der Impedanzspektroskopie erreicht man erfindungsgemäß, daß Elektrolyt-Moleküle sowie andere Substanzen in einer Meßprobe das zwischen den Elektroden anliegende elektrische Feld nur geringfügig beeinflussen und somit die Messung nicht stören.

Eine mehrfache Anordnung dieser Art feinstrukturierter Ultra-Mikroelektrodenarrays führt in vorteilhafter Weise zur Verstärkung des eben beschriebenen Effekts, in dem mit geeigneter Meßtechnik, (z. B. Impedanzmeßbrücken) sequentiell oder parallel gleichartige Messungen realisiert werden. Die Ultramikroelektrodenarrays können aus dünnen Schichten von Edelmetallen wie Gold, Platin oder Iridium oder auch Kohlenstoffmaterialien bestehen oder diese Materialien enthalten (Anspruch 16). Sie werden besonders vorteilhaft auf planare isolierende Trägermaterialien wie Siliziumverbindungen, Glas, Keramik oder organische Polymere aufgebracht, können aber auch zur Planarisierung und mechanischen Stützung in diese Materialien eingegraben oder eingelegt sein (Anspruch 17). Die optimale Annäherung zweier voneinander isolierter Ultramikroelektroden läßt sich, wie in Fig. 1 dargestellt, z.B. durch Bänder oder parallele Streifen oder mäanderförmige und runde oder schneckenartige Strukturen wie auch durch fingerartige Interdigitalanordnungen in Abständen von bevorzugt  $<1 \mu\text{m}$  erreichen. In Fig. 1 sind dazu Anordnungsbeispiele a bis d ausgeführt (siehe unten). Die Elektroden sind vorzugsweise zum Meßraum hin nicht abgedeckt.

Als eine besondere Ausgestaltung der Anordnung der Ultramikroelektrodenarrays kann vorgesehen sein, daß man ein Elektrodenarray mit einem zweiten oder mehreren überlagert und die Kreuzungspunkte durch Isolationsschichten voneinander isoliert (Anspruch 19). Auf diese Weise können Elektroden in Abständen von nur noch wenigen nm voneinander angeordnet werden,

wobei die Isolationsschicht die minimale Entfernung definiert (Fig. 1e). Allen Anordnungen der Ultra-Mikroelektrodenarrays gemeinsam ist, daß sie gut voneinander isoliert sein müssen, damit zwei, drei oder noch mehr Ultramikroelektrodenarrays durch isolierte Zuleitung auf dem Chip elektrisch unabhängig einzeln oder in Gruppen mit Gleich- und/oder Wechselstrom beaufschlagt werden können (Anspruch 20). Die für die Isolierung eingesetzten Werkstoffe (z.B. Kunststoffe oder anorganische Verbindungen wie Siliciumoxide, -nitride und keramische Materialien) müssen über den Nutzungszeitraum inert gegenüber den in der Probe verwendeten Verdünnungs- oder Lösungsmitteln (häufig Wasser) sein. Unter "Lösungsmittel" sind Reaktionsflüssigkeiten zu verstehen, in denen eine Molekülbindung, eine -anlagerung oder eine -diffusion möglich ist. Die Meßprobe muß jedoch nicht zwingend flüssig sein, auch andere Zustände sind möglich. So können die zu messenden Vorgänge auch in einem Gel ablaufen.

Zwischen den Ultramikroelektroden kann das zur Detektion benutzte elektrische Feld durch Wechselstrom mit Frequenzen zwischen 1 MHz und 10 MHz und Amplituden zwischen ca. 10 mV und 50 mV erzeugt werden. Dabei werden Potentiale zwischen 0 V und +/-5 V gewählt.

Das vorliegende Verfahren ermöglicht die Erfassung auch komplexer Reaktionsabläufe und bietet daher erweiterte Einsatzmöglichkeiten. Das Eindringen von Molekülen in den elektrodennahen Bereich mit dem aufgebauten Feld (z.B. durch Diffusion) oder die Anordnung von Molekülen in diesem Bereich, die z.B. durch sog. "self assembling" oder auch durch Komplexbildung geschehen kann, verändern sowohl die realen als auch die imaginären Größen der komplexen Impedanz und können zeitunabhängig - z.B. nach Abschluß der Ereignisse -, bei Bedarf ebenso wie der Phasenwinkel aber auch zeitabhängig, d. h. vom Fortgang des Bindungsereignisses oder der Diffusion abhängig, gemessen werden (Ansprüche 3 und 4). Für ein komplettes Impedanzspektrum wird der gesamte Frequenzbereich vermessen und ausgewertet. Besonders vorteilhaft ist die erfindungsgemäße Nutzung nur einzelner ausgewählter Frequenzen oder

Frequenzbereiche, die maximal beeinflußt werden. Dadurch gelingt es, miniaturisierte Nachweissysteme zu konstruieren.

Bei der Nutzung der Ultramikroelektrodenarrays in Flüssigkeiten  
5 oder dergleichen ist es auch möglich, zusätzlich zum Meßvorgang  
- oder aber in Meßpausen - Gleichstromanteile zu überlagern oder  
zu applizieren (Anspruch 6). Diese können z.B. elektrochemische  
Reaktionen wie Oxidationen oder Reduktionen von elektrisch  
aktiven Molekülen induzieren, wobei solche Vorgänge simultan  
10 oder sequentiell mit den Impedanzmessungen gemessen werden  
(Anspruch 7). Erfindungsgemäß ist dadurch eine Kombination  
elektrischer und elektrochemischer Messungen mit derselben  
Sensor-Anordnung (Ultramikroelektrodenarray) möglich.

15 Erfindungsgemäß kann das Verfahren zur Detektion von Molekülen  
und Molekülkomplexen ausgeführt werden, indem man die Moleküle,  
die man messen will, auf den Mikroelektrodenflächen selbst  
bindet. Diese Bindung kann eine physikalische (Adsorption) oder  
eine chemische sein. Für letztere eignen sich besonders gut die  
20 bekannten Verfahren der Selbstanordnung (englisch "self  
assembling" genannt), die es gestatten, z. B. monomolekulare  
Thiolverbindungen auf Goldelektroden zu binden und zu messen.  
Dieses Verfahren ist universell für eine große Zahl von  
Molekülen anwendbar, nicht nur für solche, die eine Thiolgruppe  
25 besitzen oder damit versehen werden können.

Ein zweites selektives Verfahren zur Anheftung von Molekülen  
oder Molekülkomplexen an die leitenden Mikroelektroden-  
Oberflächen ist die bekannte Methode der Elektropolymerisation  
30 (Anspruch 9). Dabei kann jede Elektrode individuell, in Gruppen  
oder parallel auf ihrer Oberfläche mit Elektropolymeren, z. B.  
aus den monomeren Molekülen Streptavidin, Pyrrol, Anilin,  
Vinylferrocen oder anderen elektrisch polymerisierbaren  
Substanzen, modifiziert werden. Die Bindung solcher Verbindungen  
35 in monomolekularen oder multimolekularen Schichten auf den  
Elektroden verändert das Impedanzspektrum oder einzelne  
Frequenzen in sehr charakteristischer Weise und läßt sich damit  
zeitabhängig oder nach Abschluß der Reaktion messen.

Weiterhin läßt sich das Impedanzspektrum auch dadurch meßbar verändern, daß man die Moleküle anstatt auf den Elektroden in den Elektrodenzwischenräumen positioniert (Anspruch 10). Diese Positionierung kann zum Beispiel durch chemische Bindungen (so z.B. an Siliciumdioxid) oder durch Adhäsion oder durch Reaktionen wie Kondensationsreaktionen, z.B. Silanisierungen, erfolgen. Zur Beschichtung der Gesamtflächen des Elektrodenarrays, also der Elektroden selbst wie auch der Elektrodenzwischenräume, kann man das bekannte Langmuir-Blodgett Verfahren heranziehen (Tachibana Matsumoto, Advanced Materials Ab. 11 (1993), 5/796-803), mit dem z. B. Lipide oder Phthalocyanine durch Aufziehen von monomolekularen Filmen in Schichten angeordnet werden können.

Einer weiteren Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Detektion von Molekülen und Komplexen gemäß kann die Konzentration von Molekülen in der elektrodennahen Schicht durch Diffusion verändert und die Änderung gemessen werden. Dies läßt sich sowohl mit Hilfe chemisch/physikalisch bedingter Konzentrationsänderungen als auch durch das Anlegen eines elektrischen Potentials, das einen Diffusionsgradienten erzeugt, erreichen. Weiterhin ist es möglich, die Produktion spezifischer Moleküle, beispielsweise durch Enzyme, in Elektrodennähe zu bewirken und zu messen.

Erfindungsgemäß umfaßt das Verfahren zur Detektion von Molekülen und Molekülkomplexen in einer bevorzugten Ausgestaltung die Maßnahme, daß die zuvor auf den Elektrodenarrays erzeugten Molekül-Schichten mit chemischen Haftgruppen versehen sind oder werden, die durch eine chemische Reaktion oder eine Komplexbildung weitere Moleküle binden können (Anspruch 11). Es gelingt dabei, mit hoher Empfindlichkeit derartige Bindungsereignisse zu verfolgen. Wenn beispielsweise ein niedermolekularer Komplexbildner wie Biotin über eine Thiofunktion an die Elektrode gebunden wird, kann dieser ausschließlich mit einem höhermolekularen Komplexbildungspartner, z.B. Streptavidin, an welches beliebige weitere Moleküle



gebunden sein können, komplexiert werden.

Eine besonders wichtige und sehr breit einsetzbare Anwendung des vorliegenden Verfahrens ist die Immunodetektion (Anspruch 12).

5 Dabei wird der Aufbau von Molekülschichten auf dem Ultramikroelektrodenarray nach dem Sandwich-Prinzip einer Antikörper/Antigen-Immunoreaktion vorgenommen. Zum Nachweis von Antikörpern in der Meßprobe kann man dafür beispielsweise Haptene (niedermolekulare Antigene) oder andere Antigene (häufig  
10 Proteine) an die Mikroelektrodenarrays binden. Durch die spezifische Komplexbildung zwischen den fest verankerten Antigenen und den in der Meßprobe befindlichen Antikörpern gelingt auf diese Weise ein spezifischer Antikörpernachweis. In Umkehrung dieses Prinzips kann man auch die Antikörper auf den  
15 Elektroden binden und Haptene oder dergleichen aus der Meßprobe detektieren. Das Antigen kann auch ein höhermolekulares Virus-Protein sein, das am Mikroelektrodenarray fest gebunden ist und Antikörper aus der Meßprobe zu messen gestattet. Varianten dieses Verfahrens sind der Einsatz von multivalenten  
20 Antikörpern, mit denen drei- oder mehrfache Molekülkomplexe konstruiert und gemessen werden können.

Eine weitere Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dadurch gegeben, daß man das Ultramikroelektrodenarray zur  
25 elektrischen Auslesung von Hybridisierungsvorgängen in der Nucleinsäurechemie einsetzt (Anspruch 13). Applikationen in der Gentechnologie lassen sich dann dadurch realisieren, daß man Nucleotide über Thiolbindungen oder dgl. an die Elektrodenstrukturen koppelt und die Bindung komplementärer  
30 Nucleinsäure-Bausteine durch das erfindungsgemäße Verfahren erfaßt. Diese Detektion läßt sich dadurch variieren, daß man zusätzliche Anlagerungen von Nucleinsäuren, z. B. zur Triple-DNS oder die zusätzliche Einlagerung komplexierender Moleküle in Doppel- oder Triple-Helices als Bindungsereignis einer Messung  
35 zugänglich macht (Anspruch 14). Für diese Komplexbildung oder Einlagerung können vorteilhafterweise auch Metallkomplexe genutzt werden, die das elektrodennahe Feld elektrisch besonders intensiv verändern.

Das Meßprinzip und die Veränderung des elektrischen Feldes gestattet es prinzipiell, die Molekülstruktur und -art mittels einer quantitativen Analyse des Impedanzspektrums zu  
5 unterscheiden. Eine Differenzierung nach der Art und Größe der Moleküle ist durch die quantitative Auswertung und insbesondere durch die Eichung der Impedanzspektren mit bekannten Molekülspezies möglich.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand mehrerer Figuren und einem Beispiel erläutert.

- Figur 1 zeigt mögliche Anordnungen der  
5 Ultramikroelektrodenarrays;  
Figur 2 zeigt die Adsorption von SH-Biotin;  
Figur 3 zeigt Nyquist-Plots einer mit SH-Biotin modifizierten  
und einer zusätzlich mit Streptavidin komplexierten  
Elektrode;  
10 Figur 4 zeigt den amperometrischen Nachweis von p-Aminophenol.

Figur 1 zeigt verschiedene mögliche Anordnungen von Ultramikroelektrodenarrays. Dabei ist

- 1a eine streifenförmige parallele Anordnung;  
15 1b eine mäanderförmige parallele Anordnung;  
1c eine fingerartige interdigitale Anordnung;  
1d eine kreisförmige parallele Anordnung;  
1e eine kreuzförmig gestapelte und voneinander isolierte  
Anordnung;

20

Der Anordnung der Figur 1d sehr ähnlich ist die Anordnung der Elektroden als parallel verlaufende Schnecke.

- Die voneinander isolierten Ultramikroelektroden 1 und 1' mit  
25 ihren Kontakten zur elektrischen Verbindung 2 sowie den Isolationsschichten (z.B. Siliciumnitrid) 3 auf dem Chip sind auf einem planaren Träger (z.B. ein Siliciumchip) 4 angeordnet. Bei der mehrlagigen Anordnung der Figur 1e wird durch eine Zwischenisolierung 5 die Elektrodenebene 1 von der  
30 Elektrodenebene 1' isoliert.

### Ausführungsbeispiel

- Ein interdigitales Goldelektrodenarray, strukturiert nach  
35 Figur 1c, besitzt eine Elektrodenbreite von 1  $\mu\text{m}$  und einen Elektrodenabstand von 0.7  $\mu\text{m}$ . Die Elektroden werden mit einer 1 ml, 10 mmol/l SH-Biotin-Lösung mittels Self Assembling modifiziert.

In **Figur 2** ist die Adsorption von 10 mmol/l SH-Biotin in einer 0.1 mol/l Natriumpufferlösung als Kapazitäts-Zeit-Verhalten bei einem angelegten Potential von 50 mV und einer zusätzlich aufgetragenen Amplitude von 10 mV an einem Paar interdigitaler Goldelektroden dargestellt. Die Kapazität der Elektrode erniedrigt sich nach einer Zugabe von SH-Biotin in die Lösung. Nach ca. 2000 Sekunden ist die Goldoberfläche vollständig mit -S-Biotin bedeckt. Nach 10 min. Waschen der Elektrode in 0.1 mol/l Natriumpufferlösung wird in einem nachfolgenden Schritt die adsorbierte monomolekulare Moleküllschicht mit Streptavidin durch Eintauchen der modifizierten Elektrode für 2 Stunden in eine 50 U/ml Lösung komplexiert. Nach der  $\beta$ -Galactosidase-Streptavidin Modifizierung wurde die Elektrode 10 min in 0.1 mol/l Natriumpufferlösung gespült und anschließend in eine Meßzelle gespannt.

**Figur 3** zeigt sogenannte Nyquist-Plots bei einem Potential von 50 mV, einer Amplitude von 10 mV und einem Frequenzbereich zwischen  $2 \times 10^{-3}$  Hz und  $1 \times 10^6$  Hz, gemessen als Zweipol-Impedanz. Kurve I repräsentiert die mit SH-Biotin modifizierte Elektrode, Kurve II die gleiche Elektrode nach zusätzlicher Komplexierung des SH-Biotin mit  $\beta$ -Galactosidase-Streptavidin. Die Änderung der Impedanz zeigt die Störung des Dielektrikums zwischen den Elektroden durch das komplexierte Molekül und repräsentiert außerdem eine vollzogene Bindung zwischen dem Biotin und dem Streptavidin-Enzym-Komplex.

Das Enzym  $\beta$ -Galactosidase am Streptavidin wird unabhängig als kombinierter amperometrischer Nachweis der Bindung des  $\beta$ -Galactosidase-Streptavidins an das SH-Biotin genutzt. Dieser Nachweis wird mit der Funktion der  $\beta$ -Galactosidase, der enzymatischen Umsetzung von 5 mmol/l p-Aminophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside (p-APG) zu p-Aminophenol, über eine amperometrische Oxidation-Reduktion des p-Aminophenols durchgeführt.

Figur 4 zeigt den amperometrischen Nachweis von p-Aminophenol an den gleichen Elektroden mit einem Oxidationspotential von 250 mV und einem Reduktionspotential von -50 mV gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode, nach Zugabe von 5 mmol/l p-APG in 0.1 mol/l Natriumpufferlösung in die Meßzelle. Die kontinuierliche Umsetzung von p-APG zu p-Aminophenol, welches durch den linearen Anstieg des Stromes repräsentiert wird, zeigt an, daß das Enzym die p-Aminophenolkonzentration in der Meßkammer erhöht.

**Ansprüche:**

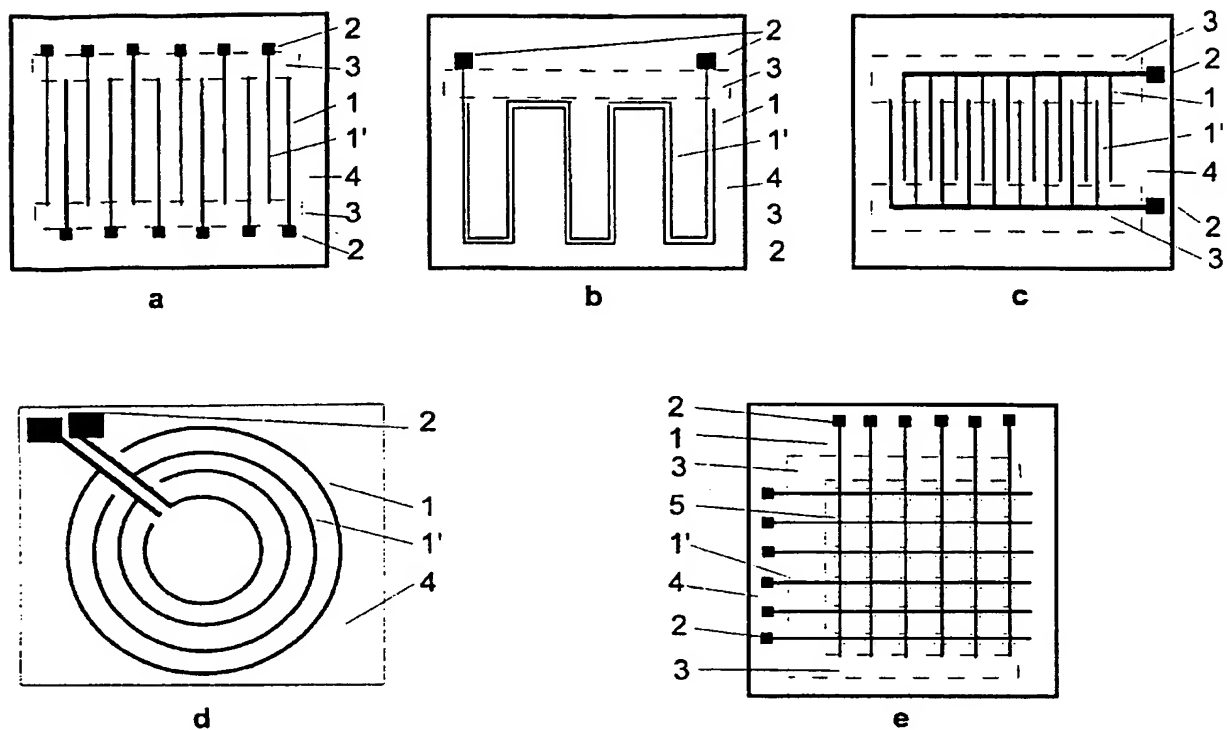
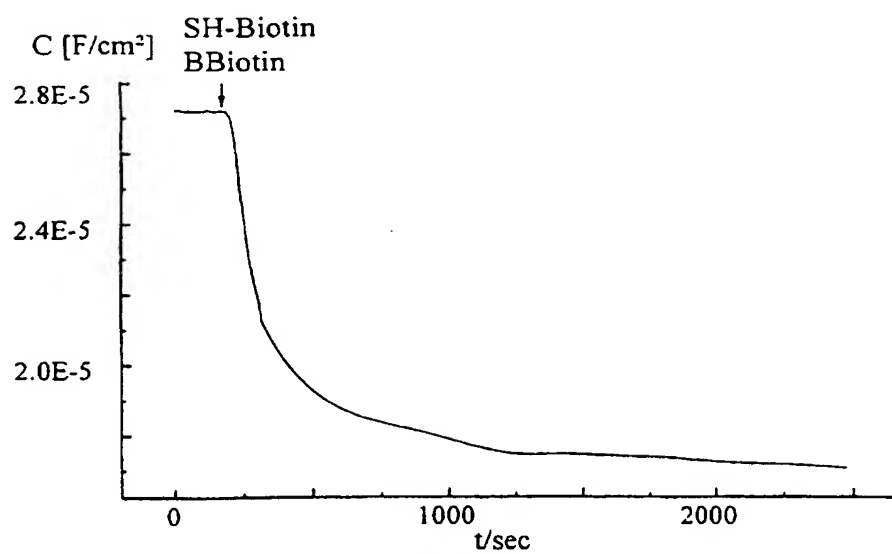
1. Verfahren zum Detektieren von Molekülen oder Molekülkomplexen, wobei
  - 5 - eine Meßprobe mit einer Ultra-Mikroelektrodenanordnung in Kontakt gebracht wird, welche mindestens zwei Elektrodenstrukturen aufweist, die derartig zueinander angeordnet sind, daß die Abstände zwischen den verschiedenen Strukturen im Ultra-Mikrobereich liegen,
  - 10 - durch Anlegen eines elektrischen Potentials ein elektrisches Wechselfeld erzeugt wird und
  - die Strom- oder Potentialveränderungen gemessen werden, die durch in der Meßprobe vorhandene oder entstehende Spezies verursacht werden.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Feldveränderungen mit Hilfe der Impedanzspektroskopie gemessen werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, worin die Verstimmung des elektrischen Feldes, die durch in der Meßprobe vorhandene oder entstehende Spezies entsteht, durch die Messung der kapazitiven und/oder der resistiven Anteile und/oder des Phasenwinkels zeitunabhängig oder zeitabhängig gemessen wird.
- 20 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin die Detektion der Moleküle oder Molekülkomplexe anhand ihrer Bindung oder Anlagerung oder Diffusion erfolgt.
- 25 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei mehrere Elektrodenanordnungen überlagert angeordnet und die Kreuzungspunkte durch Isolationsschichten voneinander isoliert sind und die Messung sequentiell, parallel oder simultan erfolgt.
- 30
- 35

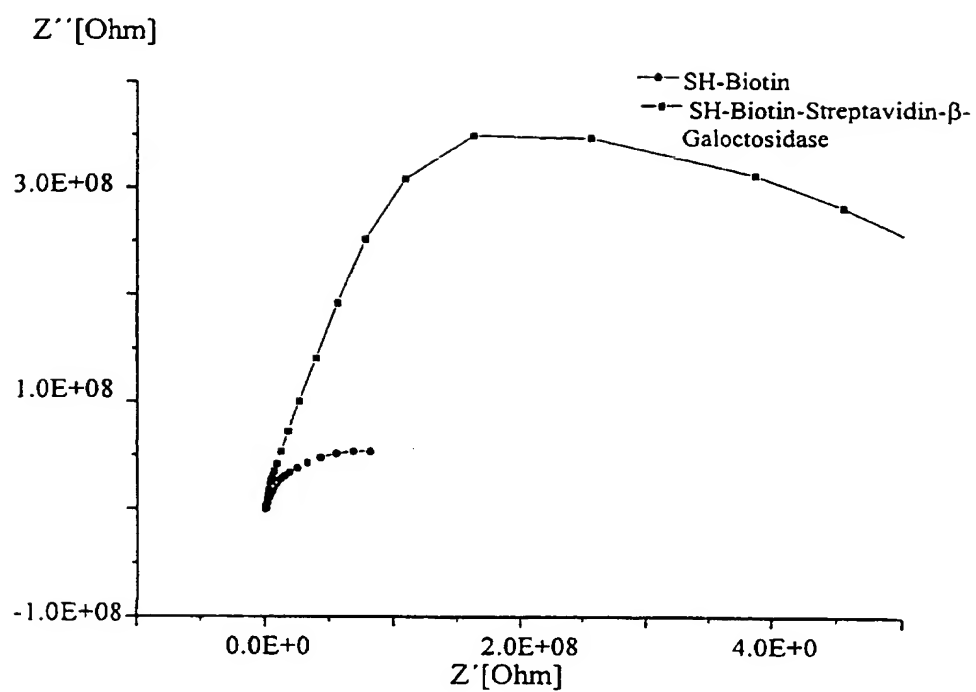
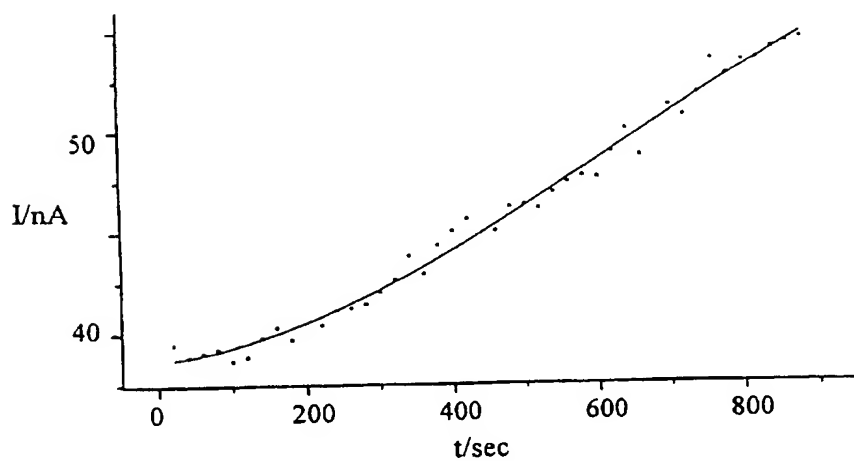
- 6 Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das elektrische Wechselfeld mit einem Gleichstromanteil überlagert oder angeregt wird.
- 5 7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei in der Meßprobe amperometrische Oxidationen oder Reduktionen oder Redox-Recycling von Molekülen mit elektrisch aktiven Gruppen oder von Redox-Mediatoren gemessen werden.
- 10 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, worin zu messende Spezies sich auf den aktiven Elektrodenflächen selbst anordnen und in gebundenem Zustand gemessen werden.
- 15 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, worin Moleküle auf den Elektrodenflächen durch Elektropolymerisation gebunden und in gebundenem Zustand gemessen werden.
- 20 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei Moleküle in den Elektrodenzwischenräumen und/oder auf der Gesamtoberfläche der Elektroden durch physikalische oder chemische Bindung fixiert und gemessen werden.
- 25 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10 wobei eine erste fixierte Molekülschicht eine Haftgruppe enthält, die selbst oder durch ein bifunktionelles Reagenz eine zweite Molekülschicht und diese gegebenenfalls weitere bindet und diese Ereignisse oder ihre Umkehr gemessen werden.
- 30 12. Verfahren nach Anspruch 11, worin die erste Molekülschicht komplexbindende Gruppen enthält, die ihren komplementären Bindungspartner binden, wobei diese Ereignisse oder ihre Umkehr gemessen werden.
- 35 13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, worin die erste Molekülschicht ein Desoxyribonukleinsäure- oder ein Ribonukleinsäurebaustein ist, der durch Hybridisierung einen komplementären Molekülstrang bindet, wobei dieses Ereignis oder seine Umkehr gemessen werden.

14. Verfahren nach Anspruch 13, worin die Molekülanordnung einen weiteren Nucleinsäurebaustein oder ein komplexierendes oder einlagerndes Molekül bindet und dieses Ereignis oder seine Umkehr gemessen wird.
- 5 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, worin die Moleküle oder Molekülkomplexe detektiert werden, indem sie nach Größe und/oder Art unterschieden werden.
- 10 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, worin die aktiven Elektrodenflächen aus Gold, Platin, Iridium oder anderen Edelmetallen, aus Kohlenstoffmaterialien oder aus anderen leitenden Materialien oder aus Kombinationen hieraus bestehen.
- 15 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, worin die Elektroden auf Siliciumverbindungen, Glas, Keramik, organische Polymere oder andere isolierende Materialien, aufgebracht oder darin eingelegt sind.
- 20 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, worin die Elektroden durch Beschichtung auf einem Substrat oder Einbettung in ein solches als Bänder oder Streifen oder kreisförmige Strukturen oder interdigitale Anordnungen im Mikrometer- oder Submikrometerabstand zueinander angeordnet sind.
- 25 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, worin die Elektroden zumindest teilweise als mehrlagige und voneinander isolierte und ggf. sich kreuzende Strukturen angeordnet sind.
- 30 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, worin die aktiven Elektrodenflächen über isolierte Zuleitungen und/oder elektronische Komponenten einzeln oder in Gruppen mit Gleich- und/oder Wechselstrom beaufschlagt werden können.
- 35

\* \* \*



**Fig. 1****Fig. 2**

**Fig. 3****Fig. 4**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/DE 97/00494

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 G01N27/12 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 299 780 A (STANFORD RES INST INT) 18 January 1989	1
Y	see page 5, line 4-16 see page 11, line 15-26	2-4,6
A	US 5 491 097 A (RIBI HANS O ET AL) 13 February 1996 see the whole document	1-20
A	WO 94 29708 A (FRAUNHOFER GES FORSCHUNG ;HINTSCHE RAINER (DE); PAESCHKE MANFRED ()) 22 December 1994 see the whole document	1-20
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 July 1997

Date of mailing of the international search report

01 Jul 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Mueller, T

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 97/00494

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SENSORS AND ACTUATORS B, vol. B28, no. 2, 1 August 1995, pages 85-94, XP000539269 KNICHEL M ET AL: "UTILIZATION OF A SELF-ASSEMBLED PEPTIDE MONOLAYER FOR AN IMPEDIMETRIC IMMUNOSENSOR" see the whole document ---	12
Y	DE 32 28 542 A (SIEMENS AG) 2 February 1984 see page 8, line 15 - page 11, line 3 ---	2-4,6
A	NTT REVIEW, vol. 8, no. 2, March 1996, JAPAN, pages 77-80, XP002035202 MORITA M. NIWA O: "Electrochemical Detection using Interdigitated Array Carbon Microelectrodes" see the whole document -----	1-20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/DE 97/00494

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0299780 A	18-01-89	US 4900405 A	13-02-90
		JP 1088354 A	03-04-89
-----			
US 5491097 A	13-02-96	US 5156810 A	20-10-92
		US 5571568 A	05-11-96
		US 5622872 A	22-04-97
		US 5427915 A	27-06-95
		US 5268305 A	07-12-93
		AT 145064 T	15-11-96
		CA 2019039 A	15-12-90
		DE 69029060 D	12-12-96
		DE 69029060 T	30-04-97
		EP 0402917 A	19-12-90
		JP 3128449 A	31-05-91
-----			
WO 9429708 A	22-12-94	DE 4318519 A	08-12-94
		AT 149686 T	15-03-97
		DE 59401964 D	10-04-97
		EP 0701691 A	20-03-96
-----			
DE 3228542 A	02-02-84	EP 0101880 A	07-03-84
		US 4919770 A	24-04-90
-----			

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/00494

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 G01N27/12 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 299 780 A (STANFORD RES INST INT) 18. Januar 1989	1
Y	siehe Seite 5, Zeile 4-16 siehe Seite 11, Zeile 15-26 ---	2-4,6
A	US 5 491 097 A (RIBI HANS O ET AL) 13. Februar 1996 siehe das ganze Dokument ---	1-20
A	WO 94 29708 A (FRAUNHOFER GES FORSCHUNG ;HINTSCHE RAINER (DE); PAESCHKE MANFRED ( ) 22. Dezember 1994 siehe das ganze Dokument --- -/-	1-20

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. Juli 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

01.08.97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mueller, T

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte: nales Aktenzeichen  
PCT/DE 97/00494

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SENSORS AND ACTUATORS B, Bd. B28, Nr. 2, 1.August 1995, Seiten 85-94, XP000539269 KNICHEL M ET AL: "UTILIZATION OF A SELF-ASSEMBLED PEPTIDE MONOLAYER FOR AN IMPEDIMETRIC IMMUNOSENSOR" siehe das ganze Dokument ---	12
Y	DE 32 28 542 A (SIEMENS AG) 2.Februar 1984 siehe Seite 8, Zeile 15 - Seite 11, Zeile 3 ---	2-4,6
A	NTT REVIEW, Bd. 8, Nr. 2, März 1996, JAPAN, Seiten 77-80, XP002035202 MORITA M. NIWA O: "Electrochemical Detection using Interdigitated Array Carbon Microelectrodes" siehe das ganze Dokument -----	1-20

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/00494

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0299780 A	18-01-89	US 4900405 A	13-02-90
		JP 1088354 A	03-04-89
-----			
US 5491097 A	13-02-96	US 5156810 A	20-10-92
		US 5571568 A	05-11-96
		US 5622872 A	22-04-97
		US 5427915 A	27-06-95
		US 5268305 A	07-12-93
		AT 145064 T	15-11-96
		CA 2019039 A	15-12-90
		DE 69029060 D	12-12-96
		DE 69029060 T	30-04-97
		EP 0402917 A	19-12-90
		JP 3128449 A	31-05-91
-----			
WO 9429708 A	22-12-94	DE 4318519 A	08-12-94
		AT 149686 T	15-03-97
		DE 59401964 D	10-04-97
		EP 0701691 A	20-03-96
-----			
DE 3228542 A	02-02-84	EP 0101880 A	07-03-84
		US 4919770 A	24-04-90
-----			